B826

物理的手法を用いた DNA 特定部位の切断と取得断片の増幅

○黒澤 修^{1,2}、鷲津 正夫² (¹(株)アドバンス、²東京大学・工・機械工学)

通常、長鎖 DNA の塩基配列解析を行う際には、ランダムに切断した断片の配列解析を行った後、各断片の重なり配列を利用して元の DNA 配列を再構築する。再構築の作業量は、断片の数が増す幾何級数的に困難になることより、このことが、長鎖 DNA の高速解析のボトルネックとなっている。もし、DNA 上の特定部位を狙って切断し、断片を回収して解析することができれば、再構築の煩雑さを軽減できると期待される。そこで、筆者らは、位置情報を保存した DNA 解析法として、基板上に DNA を伸長固定し、その一部を AFM 探針で物理的に切断回収する方法を提案し、これまでにおいて、基板上で切断した DNA 断片をほぼ損失なく回収できることを示した。今回は、切断回収した DNA 断片（数百～数千分子）を塩基配列解析を行うに十分な分子数に増幅するため、断片の両端にアダプターを付加しての PCR 増幅を行った。まず、 λ DNA を基板上に伸長配列固定した後、末端から約 $3 \mu\text{m}$ (約 9kbp) の部位を AFM 探針で切断して、約 9kbp の断片を回収した。次に、この断片を制限酵素 BbeI で消化し T4DNA ポリメラーゼで末端平滑化処理を行った後、アダプターの付加処理を行った。最後に、アダプターに相補的なプライマーを用いて PCR 増幅を行い、BbeI 処理で断片化された約 3kbp の断片の増幅量を調べた。PCR 産物のゲル電気泳動解析の結果、切断回収された断片数は約 1000 分子で、このうち BbeI 処理で断片化された約 3kbp の両端にアダプターが付加したものは約 100 分子であることが判明した。以上の結果より、制限酵素で断片化した物理的切断断片を PCR 増幅することができること、そして、増幅可能な断片数は全体の約 10 % であることが示された。この研究は、生研機構新事業創出研究開発事業「遺伝子の分子レベル操作技術」の開発の助成を受け行われたものです。ここに謝意を表します。

O. Kurosawa and M. Washizu : Amplification of DNA fragments dissected by physical method

B828

二種類の赤外レーザを用いた細胞培養のためのアガロースゲル非接触三次元加工顕微鏡システムの開発

○服部 明弘^{1,2}、森口 裕之¹、安田 賢二¹ (¹東大院・総合文化、²シグマ光機)

【目的】我々は一昨年の本会で、赤外レーザの集束光を用いたアガロースゲルへの加熱加工について報告したが、今回は新たに波長の異なる二つの赤外レーザを組み合わせることで、アガロースゲルに対し、非接触で選択的に三次元加工を行うレーザ顕微鏡システムを開発したのでこのシステムの構成と性能について報告する。

【方法】1480nm と 1064nm の二種類の赤外レーザの集束光を熱源として用いることで、ガラス基板上のアガロースに対し加熱加工を行った。あらかじめガラス基板には薄くクロムを蒸着し、その上にアガロースの層を形成した。本システムで 1480nm のレーザビームは水に吸収されるため、レーザビームが通過した部分のアガロース全てが加熱され溶解するが、1064nm のレーザビームは水とアガロースに吸収帯を持たず選択的にクロム層に吸収されるために、クロム層近傍のアガロースのみが溶解することから、このようにしてアガロース中に三次元的な構造を形成することができた。レーザビームによる加工の様子は、位相差顕微鏡に取り付けた CCD カメラで撮影し、ビデオ入力ボードを介してコンピュータのディスプレイで確認した。このディスプレイ上の画像に対し、レーザ照射したい箇所をコンピュータのマウス操作で指示することで、顕微鏡に組み込まれた自動 XY ステージによって、アガロース基板の位置決めができるようにした。以上に加えて、この顕微鏡は二つのレーザビームの光路それぞれにフォーカシング用のレンズ系を備えており、Z 方向の集光位置を独立に調節することができるようにした。

【評価】二種類の赤外レーザを使い分けることによって、厚さ 200 μm のアガロース層に対し、上部まで貫通した培養用チャンバと、チャンバ同士をつなぐトンネルとを作成できた。本会では、装置の構成やアガロースの加工結果などについて詳しく報告する。

A.Hattori, H.Moriguchi and K.Yasuda : Development of Photo-thermal Etching System for Non-contact 3D Microstructure into Agar Microculture Chip using Dual Wavelength IR Laser.

B827

ヘアピン型 DNA を利用した分子メモリスистেমの構築

○瀧ノ上 正浩¹、陶山 明^{2,3} (¹東大院・理学系・物理、²東大院・総合文化・生命環境、³JST CREST)

DNA コンピューティングは生体高分子を用いた自律的超並列計算技術である。この中で、我々は、ナノスケールでの分子制御によって実現される DNA 分子メモリスистেমの構築に初めて成功した。特異的 2 次構造を形成するヘアピン DNA 分子を設計して、メモリとして機能させる方法を考案し、実際にメモリの書き込み及び消去の実験を行った。

(1) ヘアピン DNA 分子の設計：

DNA コンピューティングの分野で培われた配列設計法を利用して、ヘアピン型 DNA 分子を設計した。Santalucia の Nearest-Neighbor パラメータを用いたイジングモデル、および Jacobson-Stockmayer 方程式に従うと仮定した熱力学的安定性に関するシミュレーションを行って、4℃～96℃の温度領域で、1 本鎖状態とヘアピン状態の 2 状態転移を行うような特異的な 2 次構造を形成するヘアピン DNA を設計することに成功した。

(2) 分子メモリへの書き込み・消去の実験：

本研究の分子メモリでは、ヘアピン DNA が 2 次構造を形成したヘアピン状態をビットの 0、形成していない 1 本鎖状態をビットの 1 に対応させることで実装した。FRET(蛍光共鳴エネルギー移動) 技術を利用した蛍光強度の変化でメモリの状態を読み取ることに成功し、設計したヘアピン DNA 分子メモリにデータが書き込まれたことを FRET の蛍光測定によって観察することができた。

ナノスケールでの分子制御にはヘアピン DNA の平衡論的及び速度論的特性を理解することが不可欠である。できればこのような物性に関する報告したい。

M.Takinoue, A.Suyama : Establishing a molecular memory system based on DNA hairpins

B829

アガロースゲルのマイクロストラクチャーを用いた培養細胞集団のトポグラフィー制御技術の開発

○森口 裕之、金子 智行、安田 賢二 (東大院・総合文化)

【目的】「細胞集団のトポグラフィー」は、細胞集団の構成細胞種とその配置、集団のサイズ・形状、などの微小解剖学的・幾何学的側面であり、多細胞生物組織の高次機能の発現とその維持に不可欠な要素として *in vitro* でも培養細胞の状態を大きく左右する因子であると考えられている。このような広範な細胞集団のトポグラフィーの機能を明らかにするためには、細胞自身に自己組織化させるだけでなく、培養細胞集団の形状、サイズ、多種類の細胞の配置などを積極的に制御する技術を用いる構成的なアプローチが有効である。以上のような観点から本研究は、新たに開発したアガロースゲルの微細加工技術を用いて作製した微細な空洞内に、任意の細胞を任意の位置に運び入れて培養することで、培養細胞集団の構成細胞数や複数種の細胞の配置を制御する技術を確立することを目的とする。

【実験技術】アガロースゲル微細加工^[1]では 1) 波長 1064nm や 1480nm のレーザ集束光を用いた局所加熱法、2) 先端にレーザ光を集光させて発熱させたマイクロニードルの先端を使用する局所加熱法、の 2 種の融解除去法を開発し使用した。以上の原理で作製したゲル内の空洞に、浮遊状態にしたマウス ES 細胞とフィーダー細胞などの複数種の細胞を、マイクロマニピュレーターに取り付けた微小ガラス管や光ピンセットを用いてハンドリングし、任意の場所に収納した。そのまま空洞内で細胞を培養し増殖させ、形成される細胞塊の形状を空洞内の微細構造に沿わせることを試みた。本会では実際に作製できた組織モデルについて、さらに細胞塊のトポグラフィーの違いにより生じる細胞の分化状態の差について報告したい。

[1] Moriguchi, et al., Lab Chip 2 (2002) pp.125-130.

H.Moriguchi, T.Kaneko and K.Yasuda : Development of New Methods for Topographical Control of Cell Clusters *in vitro* by using Agarose-gel Microstructures